同步化技术在草鱼染色体显带中的应用及草鱼核型的初步分析[1]

晏 炬[2]　刘世华　张锡元[3]　张木先
(武汉大学生物系，武昌)

摘 要

对草鱼细胞进行同步化处理，并在DNA复制的早期和晚期分别掺入BrdU，制备的染色体标本置于$CaCl_2$溶液中温浴同时用紫外线照射，然后用Giemsa染色即可分别显示出G带和R带。标本中的部分晚前期和早中期分裂相具有高分辨染色体显带特征。用这一技术对草鱼每条染色体进行识别和分析，提出了初步的草鱼核型，发现了四对草鱼染色体具有随体。

关键词：细胞同步化，染色体显带，草鱼核型

60年代末70年代初染色体显带技术的兴起，使细胞遗传学研究取得了一系列重要进展。在鱼类遗传学研究中这一技术也引起了众多学者的极大兴趣。这无疑将给鱼类染色体核型分析、环境监测等方面提供重要手段，也将为鱼类分类与进化、基因定位、基因的表达与调控等基础理论问题的研究打下良好的基础。十多年来，鱼类染色体显带的研究已获得一定的进展，如C带及核仁组织区（NOR）染色技术已获成功。但是，在G－、Q－及R－显带这些多重带显带技术方面，成功的报道不多。从所收集的少数成功的技术资料来看，其显带质量尚不能满足精确分析所有染色体和制备完整核型的要求(Blaxhall. P. C., 1983, Hartley. S. E. *et al*., 1985, Rivlin. K. *et al*., 1985)。近年来报道的大量关于鱼类染色体的分析工作，仍以常规技术进行（Al-Sabti. K., 1985, Bertolio. L. A. C., 1986）。因此，建立一种稳定有效的多重带显带技术，乃是鱼类遗传学研究方面的一个重要题课。

针对鱼类染色体制备的某些特点，将人类同步化高分辨染色体显带技术（晏炬，1985a）应用到鱼类染色体标本制备，初步获得成功，其带型的清晰程度已能基本满足识别和制备染色体核型的需要，部分分裂相的染色体变长，带纹数增加，已具有高分辨染色体显带的特征。现将方法报道如下，并就有关问题进行讨论。

（1）中国科学院科学基金资助的课题
（2）现在同济医科大学医学遗传室
（3）课题指导者
周暾、蒋建桥老师指导核型分析，特此致谢。
本文1987年8月3日收到，同年11月9日修回。

材料和方法

取材及同步化前处理：草鱼（*Ctenopharyngodon idellus*）取自武汉某养殖场，平均体长约15cm，实验共用20余尾。按下述两种方法进行同步化前处理。

一、体外短期培养法

取草鱼，常规消毒体表，在无菌条件下剖开腹腔，小心取出紧贴于脊椎的肾组织，置无菌的小平皿内，加入少量培养基，将肾组织尽量捣碎制成细胞悬液，按1～3×10^6个细胞/毫升分别接种于2～4个培养瓶内。培养基为含20%新生牛血清的RPMI 1640，以PHA作有丝分裂原，将培养物置30°C恒温培养箱培养56～60小时，待作同步化处理。

二、体内注射法

经草鱼胸鳍基部往腹腔内注射10%酵母液，处理24小时，次日同上法取出肾组织制成细胞悬液，并分别接种于2～4个培养瓶中待用。

同步化处理：以上两种方法的标本，每一种都分别按如下二种程序继续进行同步化培养。

一、用于R显带的培养

往培养物中加入过量胸腺嘧啶核苷（TdR），最终浓度为0.3mg/ml，置30°C内培养17小时后取出，用不含血清的培养基（或Hank's液）洗细胞两次，换入含血清的培养基，并加入5－溴脱氧尿嘧啶核苷（BrdU），最终浓度为50μg/ml，继续培养5～7小时，收获细胞前用秋水仙素处理15～30分钟。

二、用于G显带的培养

往培养物中加入BrdU，最终浓度为200μg/ml。置30°C恒温培养箱内培养17小时。同样洗细胞两次，然后以TdR处理5～7小时（最终浓度为2.4μg/ml）。收获细胞前用秋水仙素处理15～30分钟。

标本的制备及染色体显带

终止培养，离心后收集细胞，以0.0375*M* KCl室温下低渗10～15分钟，用新配制的3：1甲醇和冰醋酸固定细胞三次，最后制成适当浓度的悬液，滴在用冰水浸过的洁净载玻片上。标本片置37°C温箱内过夜或室温下存放3天以上，按以下技术进行显带处理：取两个直径为12cm的平皿，盛入0.2%$CaCl_2$溶液，平皿下面用水浴恒温箱将$CaCl_2$溶液的温度控制在55°C，将上述不同方法制备的标本片平放于平皿中，有细胞的一面向上，让溶液刚好盖过玻片表面约2mm，同时在标本片上放置一盏30瓦紫外线灯，灯管距片子表面约5cm，温浴和照射30分钟后，将标本取出，用5%的Giemsa染液染色20～30分钟，自来水冲洗，晾干后即可在显微镜下观察。

结　果

用过量的BrdU或TdR阻止增殖的细胞在S期，并适时地解除干扰，以使细胞的增殖达到同步化，并利用BrdU在DNA复制的不同时期掺入相应的染色体节段，制备的标本

片再经紫外线照射及 $CaCl_2$ 溶液温浴后，以 Giemsa 染色即能在染色体上显出不同的带型。应用这一技术的结果显示，染色体带纹清晰。因BrdU掺入DNA 复制的时间早晚不同而获得两种多重带型：在同步化培养一开始就加入BrdU的，BrdU掺入早复制的DNA片段，在染色体上显出的带相当于G带；在同步化培养17小时后再加入 BrdU 的，BrdU掺入晚复制的DNA片段，在染色体上显出的带相当于R带。经初步比较二种显带的部分染色体，证明两种带型正好相反（图１）。

参照 Leven（1964）提出的命名法，结合染色体带型特征，挑选出３个带型清晰的G带分裂相的显微摄影照片，进行了初步的核型分析。众数为2n＝48，可分为A、B、C三组：A组为中着丝粒染色体（m），共８对；B组为亚中着丝粒染色体（sm），共12对；C组为亚端着丝粒染色体（st），共４对。几乎所有染色体都显示出清晰的带纹，大多数同源染色体带纹一致，给核型的制备提供了更为准确的依据（图２）。在所分析的G带核型中，意外地发现每个细胞中都有４对染色体具有明显的随体（图３），分别为A组２号，B组８号和12号，C组４号。这一结果迄今还未见报道。

此外，在标本中部分分裂细胞处在早中期甚至晚前期，染色体变长，带纹数趋于增多，已表现出高分辨显带染色体的特征（图４、５），为提高染色体的分辨率打下了良好的基础。

在同步化培养前对标本的两种处理方法，即体外短期培养和活体内注射，经对比后者效果较佳。

讨　　论

1.选择一种合适的细胞培养方案及有效的有丝分裂原，是获得良好染色体标本的首要条件。一般有二种技术，即直接法和组织培养法。后者需一定的技巧及较多的条件，而前者对这些要求相对较低。至于有丝分裂原，多选用 PHA 。然而 Hartley. S. E.1985）发现用LPS对某些种类的鱼更有效。在初期的实验中，我们采用短期鱼肾组织培养，用PHA作有丝分裂原，结果分裂指数较低。后将同步培养前的操作改在活体鱼内进行，并用酵母液作有丝分裂原，在一定程度上提高了分裂指数。实践证明，因不用３天的体外培养，故标本制备的周期缩短，操作时的无菌要求也相对较低，是一种较实用的方法。

2.因鱼类染色体形态小，数目多，外加一些其它客观条件的差异，故对于多重显带技术来说，是学者们所公认的一个难题。Hartley. S. E.等（1985）认为鱼类染色体缺乏清晰的G带，是由于染色体蛋白的差异而造成的。Rivlin. K.等（1985）认为鱼类染色体呈高度凝缩状态而妨碍了带的分解。近年来洪云汉和周暾（1985）在哺乳动物及两栖类动物的染色体复制带显带技术，（Cawood. A. H., 1981, Schempp. W., 1981）基础上建立起鱼的染色体复制带显带技术，这一技术可望为改善鱼类染色体的显带质量开辟一条新的途径。它是利用DNA复制的非同步性，使BrdU 掺入到S期正在进行DNA复制的染色体某些节段，这些结合了BrdU的染色体节段将被Giemsa 染成浅兰色或不着色，而没有结合 BrdU 的节段染成红色，由此在染色体的纵长上产生许多深浅相间

的带纹。由于培养中的细胞也处在非同步状态，细胞分布在增殖周期的各个时相内，故开始接触BrdU时的起点不一致，即某个细胞处在S期的开始阶段，而另一细胞可能正处在S期的晚期，这样对于这两个细胞中的某号特定染色体来说，就会产生绝然不同的结果。由于在接触BrdU时正好处在增殖周期同一时相的细胞数目有限，对于精确分析和制备鱼类染色核可能是不利的。为此，我们在人类染色体高分辨显带技术的基础上，设计出鱼细胞的同步化培养方案，以便使培养中的细胞同步在S期，并分别在S期的前半期和后半期掺入BrdU，从理论上讲，这样就能使早复制带和晚复制带分别显示在用两种不同方法处理的标本中。人类染色体制备的同类技术证明，正是显示了两种带型（晏矩，1985[a]），且由于染色体上早复制和晚复制节段的交替排列，二种带型正好相反。

一般认为，G带的阳性带为晚复制区，R带的阳性为早复制区（Camargo. M.等1981, Cawood. A. H. 等，1981）。在S期一开始就掺入BrdU，一定时间后洗去该试剂，并换以TdR，去除BrdU对晚S期才复制的染色体节段的影响，经一定处理后，掺入了BrdU的早复制节段着色较浅，没有掺入BrdU的晚复制节段着色深，就形成“G”带。相反，如用TdR将细胞同步在S期，经一段时间后洗去TdR，并立即向培养物中加入BrdU，这时BrdU就会结合到染色体晚复制的节段上，成为浅染的R带区。从我们观察到的鱼染色体显带情况来看，基本符合上述观点。

由于在细胞增殖过程中采用了过量的BrdU或TdR，干扰了DNA的合成，使细胞一度阻止在S期，后经去除这些试剂的作用，就造成细胞的同步发育，而且因收获细胞的时间相对提前（秋水仙素只作用15～30分钟），故标本中部分分裂细胞处在早中期甚至晚前期，致使染色体变长，带纹数也相应增加，这无疑对提高染色体的分辨率是极为有利的。目前，由于对鱼类染色体带型的识别及核型制备还缺乏经验，因此对于高分辨带型的识别尚有一定困难，但这一技术仍不失为这项研究工作的良好开端。

3.关于染色体显带所用的紫外线照射和$CaCl_2$溶液的温浴条件，在研究人类染色体方面曾有过报道（晏矩等，1985[a]，1985[b]，Scheres. J. M. J. C, 1977）。该方法操作简单，结果稳定，省去了较难得到的Hoechst-33258试剂及有关的操作，便于推广。用含有二价阳离子的$CaCl_2$溶液温浴，能增加显带的稳定性（Scheres. J. M. J. C., 1977），这也已为过去的实验所证实。

在Leven命名体制的基础上，根据染色体带型特征对3个草鱼G带标本进行了初步的核型分析。结果众数为48，按着丝粒的位置不同将其分为三组。与其他作者的工作，（昝瑞光，1979；刘凌云，1980；周暾，1984）相比，各组的染色体数分布不尽相同（表1）。每一组内的同源染色体带型基本一致，且在不同分裂相中，同号染色体的基本带

表1 草鱼核型的比较

种 类	2n	核 型	作 者
草鱼	48	16m+26sm+6st	周 暾 1984
草鱼	48	16m+32sm	刘凌云 1980
草鱼	48	18m+22sm+8st	昝瑞光 1979
草鱼	48	16m+24sm+8st	本 文

型稳定出现，这样能够更为准确和客观地辨认染色体，为今后的鱼类染色体显带核型的标准命名打下了良好的基础。

在我们所分析的G带标本中，多数染色体具有很强的带形特征，如A组1号染色体，着丝粒区深染，长、短臂上各分布4～5条深带，短臂远端的带较浅；C组的第一对染色体在整个染色体组中最大，短臂全部深染，整个长臂上分布着8～9条深带，尤以远端的3～4条带为深，而中部的3～4条带要浅得多。据此可以很准确地辨认这样的染色体。

值得注意的是，在所分析的G带核型中，意外地发现每个细胞中都有4对染色体具有明显的随体，且随着染色体长短的不同，其明显的程度也不同，即越近晚中期的分裂细胞（染色体较短者）其随体越清晰明显（图3）。按其着丝粒的位置将其分别归于相应的组中。鱼类染色体出现随体，在以前的非显带标本分析中偶见报道，但数目不定，也无一定规律，而我们观察到的这一现象是非随机的，这对于鱼类的发育、进化及分类的研究可能具有一定的意义。随体的出现，可能与我们所采用的复制带技术有关，提示鱼类染色体的随体部位DNA复制较晚，与其它G带阳性带一样被染成深色。

参 考 文 献

洪云汉　周暾　1985　遗传学报　12（1）：67—71。

刘凌云　1980　动物学报　26（2）：126—131。

昝瑞光等　1979　遗传学报　6（2）：205—210。

晏矩等　1985 a　遗传与疾病　2（1）：38—39。

晏矩等　1985 b　中华医学检验杂志　8（1）：55—56。

周　暾　1984　动物学研究　5（1）：38—51。

Al-Sabti. K. 1985 *J. Fish Biol.* 26:5-12.

Bertollo. L. A. C. 1986 *J. Fish. Biol.* 28:153-159.

Blaxhall. P. C. 1983 *J. Fish Biol.* 22:417-424.

Camargo. M. *et al.* 1981 *Cytogenet Cell Genet.* 31:77.

Cawood. A. H. 1981 *Chromosomal (Berl).* 83:711-720.

Hartley. S. E. *et al.* 1985 *J. Fish Biol.* 26:575-582.

Rivlin. K. *et al.* 1985 *J. Fish Biol.* 26:267-272.

Schempp. W. *et al.* 1981 *Chromosomal (Berl).* 83:697-710.

Scheres. J. M. J. C. 1977 *Cytogenet Cell Genet.* 18:2.

图版 I 说明

图1. 经两种不同技术的处理，同号染色体的带型正好相反，图示A组1号（右）和C组1号染色体（左）。每一对中，左为G带，右为R带。

图2. G带核型，A_2、B_3、B_{12}和G_4可见随体。

图3. 三个不同中期细胞中具有随体的4对染色体。

图4. 经同步化处理后得到的晚前期细胞（R带）。

图5. 经同步化处理后得到的早中期细胞（G带）。

THE APPLICATION OF CELL SYNCHRONIZATION TO CHROMOSOME BANDING OF FISH AND THE TENTATIVE KARYOTYPE ANALYSIS OF *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

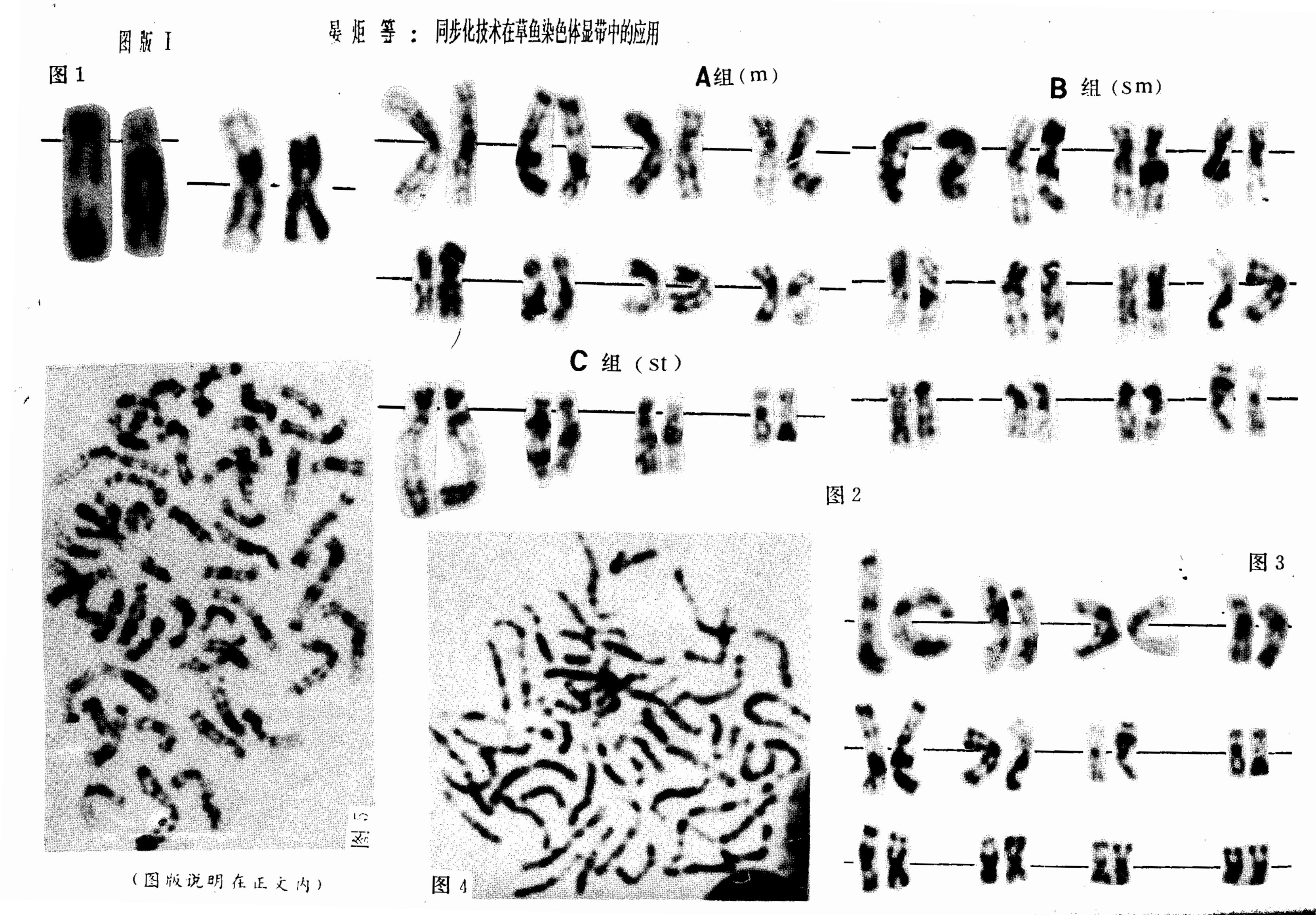
Yan Ju, Liu Shihua, Zhang Xiyuan, Zhang Muxian

(Biology Department, Wuhan University)

Combining cell synchronization in vitro and bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in early synthesis phases and late synthesis phase of cells of *Ctenopharyngodon idellus*, two kinds of chromosome patterns of replication banding, R- and G-bands were gained after chromosome preparation were irradiated in warm $CaCl_2$ solution by UV and were stained with Giemsa. Some spreads lengthened in late-prophase and prometaphase show more numbers of bands and characteristics of higher resolution. Analysis of G-banded karyotype shows that there are four pairs of chromosomes with satellite.

A tentative idiogrammatic representation of G-banded karyotype of Ctenopharyngodon idellus is proposed. the significance, techniques and possible mechanism of chromosome banding of fish are discussed.

Key words: cell synchronization, chromosome banding, karyotype of *Ctenopharyngodon idellus*.



（图版说明在正文内）